7 月 July
2020, 63(7): 825 – 834

昆 虫 学 报
ACTA ENTOMOLOGICA SINICA

http://www.insect.org.cn
doi: 10.16380/j.kcxb.2020.07.006

扩头蔡白蚁肠道蛋白的鉴定

苏丽娟, 伍志伟, 高新浩, 赵鹏飞, 肖元玺, 楚君鹏, 宋安东*

(河南农业大学生命科学学院, 郑州 450002)

摘要:【目的】本研究旨在分析比较扩头蔡白蚁 *Tsaitermes ampliceps* 工蚁前中肠和后肠及其内容物的蛋白构成和表达差异,挖掘降解木质纤维素的相关酶和蛋白。【方法】通过扩头蔡白蚁工蚁的前中肠和后肠及其内容物蛋白的双向电泳,对高表达或高差异表达的 47 个蛋白点进行 MALDI-TOF/MS 测序,并进行生物信息学分析。【结果】测序分析发现,扩头蔡白蚁肠道及其内容物蛋白中有结构蛋白 13 个、调节蛋白 9 个、白蚁代谢相关蛋白 10 个、微生物代谢相关蛋白 7 个。经 PD Quest 分析发现,在前中肠和后肠有 11 个蛋白均高表达;仅在前中肠表达的蛋白有 12 个,主要是白蚁代谢相关蛋白和调节蛋白;仅在后肠表达的蛋白有 8 个,主要是微生物代谢相关蛋白。整个肠道内参与木质纤维素降解的相关酶有 5 个,分别是白蚁自身分泌的内源性纤维素酶,细菌产生的内切-β-1,4-葡聚糖酶和过氧化物歧化酶以及原生动物产生的 GH11。【结论】白蚁对木质纤维素食物的降解主要在前中肠,后肠对降解产物进一步降解并进行微生物生长代谢。这些降解产物和微生物菌体蛋白为白蚁的肛哺提供营养成分。

关键词: 扩头蔡白蚁; 肠道; 差异表达蛋白; 木质纤维素; 双向电泳; MALDI-TOF/MS

中图分类号: Q966　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 0454-6296(2020)07-0825-10

Identification of proteins in the gut of *Tsaitermes ampliceps* (Isoptera: Rhinotermitidae)

SU Li-Juan, WU Zhi-Wei, GAO Xin-Hao, ZHAO Peng-Fei, XIAO Yuan-Xi, CHU Jun-Peng, SONG An-Dong* (College of Life Sciences, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract:【Aim】The aim of this study is to analyze and compare the composition and expression difference of proteins in the fore- and midgut and the hindgut including gut contents of *Tsaitermes ampliceps* workers, and then to excavate the enzymes and proteins that can degrade lignocellulose. 【Methods】By two-dimensional electrophoresis of the proteins in the fore- and midgut and the hindgut including gut contents of *T. ampliceps* workers, 47 protein spots with high expression or high expression difference were sequenced by MALDI-TOF/MS and subjected to bioinformatics analysis.【Results】The sequence analysis showed that there are 13 structural proteins, 9 regulatory proteins, 10 termite metabolism-related proteins and 7 microbial metabolism-related proteins in the gut and gut content proteins of *T. ampliceps*. The PD Quest analysis showed that 11 proteins were highly expressed in both the fore- and midgut and the hindgut, 12 proteins mainly related to metabolism and belonging to regulatory proteins were expressed only in the fore- and midgut, and 8 proteins mainly related to microbial metabolism were expressed only in the hindgut. There are five enzymes involved in the degradation of lignocellulose in all the gut proteins, including endogenous cellulase secreted by termites themselves, endo-β-1,4-glucanase and peroxidase produced by bacteria, and GH11 produced by protozoans.

基金项目: 国家自然科学基金项目(31170350); 河南省基础与前沿技术研究项目(142300410150); 河南省高等学校重点科研项目应用研究计划(20A210004)

作者简介: 苏丽娟, 女, 1972 年 2 月生, 河南宜阳人, 副教授, 研究方向为昆虫生理生化, E-mail: sulijuan816@126.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: songandong@henau.edu.cn

收稿日期 Received: 2019-11-26; 接受日期 Accepted: 2020-01-16

【Conclusion】The degradation of lignocellulosic food is mainly in the fore- and midgut, and the further degradation of the degraded products and the metabolism of the products for microbial growth are mainly in the hindgut. The degraded products and bacterial proteins provide nutrients for anal feeding of termites.

Key words: *Tsaitermes ampliceps*; gut; differentially expressed proteins; lignocellulose; two-dimensional electrophoresis; MALDI-TOF/MS

木质纤维素是地球上非常富有的可再生生物质资源,主要由纤维素、木质素和半纤维素等成分组成(相辉和周志华, 2009),但是,生物质资源的利用和转化受到原料自身抗降解屏障特性的影响,成为制约其产业化发展的主要障碍,因此,探索自然生物系统中能够高效转化木质纤维素的技术体系成为解决这一瓶颈的重要途径。据统计,有 100 多种昆虫被证实具有明显的消化木质纤维素的能力,比如蜚蠊目的食木蟑螂 *Panesthia cribrata* 和白蚁、缨尾亚目的蠹虫、鞘翅目的天牛等(Martin, 1983; Slaytor, 1992; Lawton *et al*., 1996; Mohr and Tebbe, 2006),在这些昆虫中,白蚁消化木质纤维素的效率最高,可以在 24 h 内消化摄入植物中高达 99% 的纤维素,而其他食木昆虫对纤维素的消化率只有 12% ~68% (Sun and Scharf, 2010)。如此高效的木质纤维素消化能力使白蚁成为研究高效利用木质纤维素资源的热点,研究者希望通过对白蚁的研究,发掘新型、天然、高效的木质纤维素酶,了解白蚁肠道内酶对木质纤维素的转化特征,解开昆虫肠道转化木质纤维素之谜,为高效转化木质纤维素为生物能源及生物基产品奠定基础。白蚁(工蚁)消化道呈螺旋形,主要由前肠、中肠和后肠 3 部分组成(Brune and Stingl, 2006)。白蚁后肠相当发达,约占全部肠道总容积的 4/5 之多,主要负责吸收水份、无机盐及排除代谢废物等(Schmitt-Wagner *et al*., 2003; 陈虹等, 2005; 苏丽娟等, 2011)。因此,白蚁作为小型动物生物反应器,由进行物理消化的研磨器(具有强大咀嚼能力的口器)和生化消化的反应池(即消化道)组成,生化消化主要是指由复杂的微生物区系和木质纤维素酶系参与的木质纤维素的降解和转化(Zhou *et al*., 2007)。

迄今为止人们对白蚁纤维素酶系统的研究主要分两类,一是用基因组、转录组和蛋白组学的方法对木质纤维素降解酶进行鉴定和甄别,二是对酶进行基因克隆、表达或者分离纯化后测定其酶学特性,希望对这些酶的生产应用提供资料。比如,研究者对低等白蚁如北美散白蚁 *Reticulitermes flavipes*、达尔文澳白蚁 *Mastotermes darwiniensis*、山林原白蚁 *Hodotermopsis sjostedti*、恒春新白蚁 *Neotermes koshunenses* 和黄胸散白蚁 *Rhticulitermes speratus* 等的肠道微生物的酶系和酶蛋白进行了研究(Zhou *et al*., 2007; Tartar *et al*., 2009; Hongoh, 2010; Franco Cairo *et al*., 2011; Xie *et al*., 2012),也对高等白蚁锯白蚁属的 *Microcerotermes* sp.、*Trinervitermes trinervoides* 及象白蚁 *Nasutitermes* 的囊形胃内容物等进行宏基因组学分析(Zhang *et al*., 2009; Watanabe and Weissman, 2010; Nimchua *et al*., 2012; Rashamuse *et al*., 2017),白蚁肠道内容物中发现的纤维素酶最多,也有木聚糖水解酶、果胶酶和淀粉酶,包括纤维素酶(GH1, GH3, GH5, GH7, GH9 和 CBM6 等),半纤维素酶(GH2, GH8, GH10, GH11, GH16, GH43 和 CBM 27 等)和果胶酶(GH28 和 GH29 等),这些酶多为内源性纤维素酶。另外,研究者用不同方法克隆和表达了一些白蚁的木质纤维素酶基因,例如:对北美散白蚁 *R. flavipes* 的研究最多,包括 3 个来自于白蚁后肠原生动物的纤维素酶 GHF7-3, GHF7-5 和 GHF7-6(Sethi *et al*., 2013),肠道中分离到的漆酶亚型 RfLacA 和 RfLacB(Coy *et al*., 2010),唾液腺分泌的内源性内切 β-1,4-葡聚糖酶 RsEG(Hirayama *et al*., 2010);黄胸散白蚁的 GH45 家族的内切 β-1,4-糖苷酶(Otagiri *et al*., 2013)和木糖异构酶(Katahira *et al*., 2017);乳白蚁属台湾乳白蚁 *Coptotermes formosanus* 的两种内源性 BG 同源物 CfGlu1B 和 CfGlu1C(Feng *et al*., 2015);高山象白蚁 *Nasutitermes takasagoensis* 后肠的 NtEG 可水解纤维素糊精的 β-1,4-纤维素链成纤维二糖和葡萄糖(Hirayama *et al*., 2010);象白蚁属 *Nasutitermes corniger* 的工蚁和兵蚁肠道提取物中检测到了多种纤维素酶(内切葡聚糖酶、外切葡聚糖酶、β-葡萄糖苷酶)、半纤维素酶(β-木聚糖酶, α-l-阿拉伯呋喃糖酶, β-d-木聚糖酶)、α-淀粉酶、蛋白酶(trypsin-like, chymotrypsin-like, keratinase-type)(Lima *et al*., 2014);黑翅土白蚁 *Odontotermes formosanus* 的肠道真菌产生的纤维素酶具有 Eg 酶

和 β-1,4-糖苷酶活性(Duan *et al*., 2017)。

经过近几十年的研究,人们对白蚁肠道内容物中降解木质纤维素的机理有了较为深刻的理解,但还远远不够,需要进一步的研究。本研究用双向电泳(2-DE)和 MALDI-TOF/MS 测序联用的方法直观显示了扩头蔡白蚁 *Tsaitermes ampliceps* 肠道及其内容物的蛋白构成及这些蛋白在前中肠和后肠的表达差异,并对测到的木质纤维素酶的结构进行了预测,为理解白蚁降解木质纤维素的机理,挖掘白蚁生物系统中的高效降解酶提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　白蚁采集及肠道内容物提取

扩头蔡白蚁采自河南省信阳商城县金刚台乡(31°79′N, 115°50′E),采集到的扩头蔡白蚁首先进行物种鉴定,然后在黑暗、22 ~ 30℃、潮湿(湿度 > 50%)的条件下饲养,取数千头(前中肠 4 000 头、后肠 1 000 头)扩头蔡白蚁工蚁,用解剖针从扩头蔡白蚁腹尖轻轻拉出肠道(图 1),分离前中肠和后肠,放入 0.2 mol/L PBS 溶液中,匀浆肠道及其内容物样品(冰上操作),2 000 r/min 4℃离心 30 min,吸取上清。

1.2　肠道内容物蛋白提取和纯化

将 1.1 节获得的粗蛋白溶液用 0.22 μm Micro PES 树脂(用 MillQ 水湿润过)过滤,加入 1/4 体积的 50% TCA-丙酮(5 g 三氯乙酸,加去离子水溶解,定容至 10 mL),冰浴。离心弃上清,加入冰丙酮(内含 0.01 mol/L DTT,保存在 -20℃冰箱中),冰浴。4℃ 12 000 r/min 离心 30 min,弃上清。加入蛋白提取液[SDS 0.15 g, 1 mol/L Tris-HCl (pH 7.6) 1.5 mL, DTT 0.015 g, 0.5 mol/L EDTA-Na_2 0.1 mL, 蔗糖 3 g, 加 MillQ 水定容至 10 mL],40 ~ 50℃加热 30 min,溶解沉淀,20℃ 12 000 r/min 离心 30 min,弃上清。加入 0.1 mol/L 乙酸铵甲醇溶液(乙酸铵 0.77 g,加入甲醇溶解并定容至 100 mL)涡旋混匀,冰浴离心,弃上清。再用冰甲醇溶液(内含 0.01 mol/L DTT,保存在 -20℃冰箱中)清洗固体沉淀。加入含有尿素、硫脲和 CHAPS 等试剂的裂解液(尿素 4.2 g, 硫脲 1.52 g, CHAPS 0.4 g) 15℃ 220 r/min 震荡溶解 30 ~ 60 min,样品蛋白质浓度采用 Bradford (1976)法测定,确保蛋白样品浓度 1 μL≥12 μg 蛋白量,之后放在 -20℃冰箱保存。

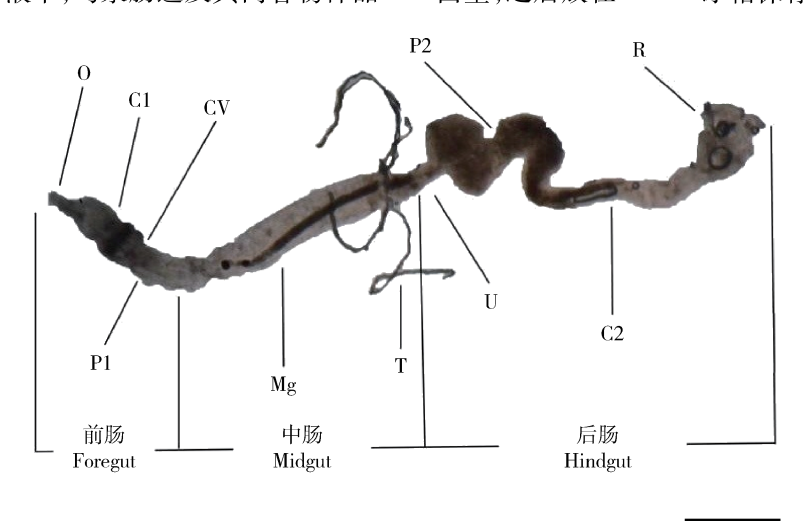


图 1　扩头蔡白蚁工蚁肠道解剖示意图

Fig. 1　Anatomy sketch of *Tsaitermes ampliceps* worker gut

O: 食道 Oesophagus; C1: 嗉囊 Crop; CV: 贲门瓣 Cardiac valve; P1: 前胃 Proventriculus; Mg: 中肠 Midgut; T: 马氏管 Malpighian tubules; U: 肠道瓣前节 Segment preceding the enteric valve; P2: 囊形胃 Paunch; C2: 结肠 Colon; R: 直肠 Rectum.

1.3　双向电泳

1.2 节蛋白样品置室温溶解,加入 0.01 g DTT 充分混匀即为水化上样缓冲液。取出冷冻保存的线性 IPG 预制胶条(11 cm, pH 4 -7),室温放置 10 min,沿着聚焦盘的边缘从左到右线性加入等量(体积和质量)的蛋白样品 (在槽两端各 1 cm 左右不要加样,中间的样品液一定要连贯且不要有气泡,否则会影响到胶条中蛋白质的分布),当蛋白质样品都加入到聚焦盘中后,用镊子轻轻地去除预制 IPG 胶条上的保护层。分清正负极,轻轻地将 IPG 胶条胶面朝下置于聚焦盘或水化盘中样品溶液上,使得胶条的正极(标有 +)对应于聚焦盘的正极。在每根

胶条上覆盖矿物油,防止胶条水化过程中液体的蒸发。需缓慢地加入矿物油,沿着胶条使矿物油一滴一滴慢慢加在塑料支撑膜上,对好正负极,设置等电聚焦程序。

等电聚焦程序为:电流保证不超过 50 μA, S1 50 V 主动水化 12 h→S2 200 V 线性 1 h→S3 1 000 V 快速 1 h→S4 9 000 V 线性 2 h 升压→S5 9 000 V 聚焦 8 h→S6 500 V 快速,可以保持 12 h,聚焦结束的胶条立即用平衡缓冲 I 和平衡缓冲液 Ⅱ 进行平衡。配制 12% 分离胶和 5% 浓缩胶进行第二向 SDS-PAGE 电泳。恒温 15℃,先用低电压 100 V/gel/11 cm、后用 200 V/gel/11 cm 电泳,考马斯亮蓝 R250 溶液染色胶,冰乙酸脱色后凝胶成像。

1.4 生物信息学分析和 MALDI-TOF/MS 测序

染色后的凝胶用 ImageScanner 扫描,用 PDQuest 软件分析图谱,分析白蚁前中肠和后肠中的高表达和差异表达蛋白,确认其显著差异的蛋白(灰度比值大于 2)。用双向电泳的至少 2 个标准蛋白质计算样品胶中蛋白质点分子量和等电点的实验值。选取高表达和显著差异表达蛋白质点,用灭过菌和去头的黄色枪头沿着染色边缘切下差异蛋白点放入 Eppendorf 管中,进行蛋白质溶解,由上海博苑科技生物技术有限公司测序。

用 MALDI-TOF/MS 的数据采集软件 Flexcontro. 1 3.0 对样品孔的数据进行采集,每孔取 10 个进行激光点击其不同位置。运用数据库 World-2D PAGE, UniProt, ExPASy, NCBI 和 GenBank 等通过数学和计算机技术手段对生物信息进行收集、加工、存储、分析与解析方法来诠释实验的结果。通过 Cn3D 4.3 软件预测了酶蛋白的高级结构,并用 SignalP 4.1 Server 软件分析了 5 个蛋白的信号肽序列信息。

2 结果

2.1 扩头蔡白蚁肠道及其内容物蛋白的电泳结果

扩头蔡白蚁前中肠和后肠及其内容物蛋白的双向电泳图谱如图所示(图 2: A, B),从图中可以看出,蛋白点清晰透亮种类多,且白蚁前中肠内容物蛋白与后肠的差异明显,适合对白蚁前中肠和后肠内容物蛋白进行差异比对研究。用 PDQuest 软件分析发现,白蚁前中肠有 182 个可分辨蛋白点,后肠有 108 个可分辨蛋白点,其中有 28 个蛋白在前中肠和后肠均高效表达、78 个蛋白仅在前中肠表达、37 个蛋白仅在后肠表达,排除独有的蛋白点,有 23 个蛋白在前中肠的表达量大于后肠的 2 倍、31 个蛋白在后肠的表达量大于前中肠的 2 倍。图 2(C)为加 1% CMC-Na 筛选底物的 SDS-PAGE 电泳图谱,从图中可以看出白蚁肠道内容物纤维素降解酶的分子量大小范围,前中肠的蛋白分子量分别为在 25 ~ 28 kD 和 43 ~ 85 kD 范围内,后肠的在 35 ~ 85 kD 范围内,所以该筛选图谱可以为扣点测序的蛋白分子量范围提供有力的依据。

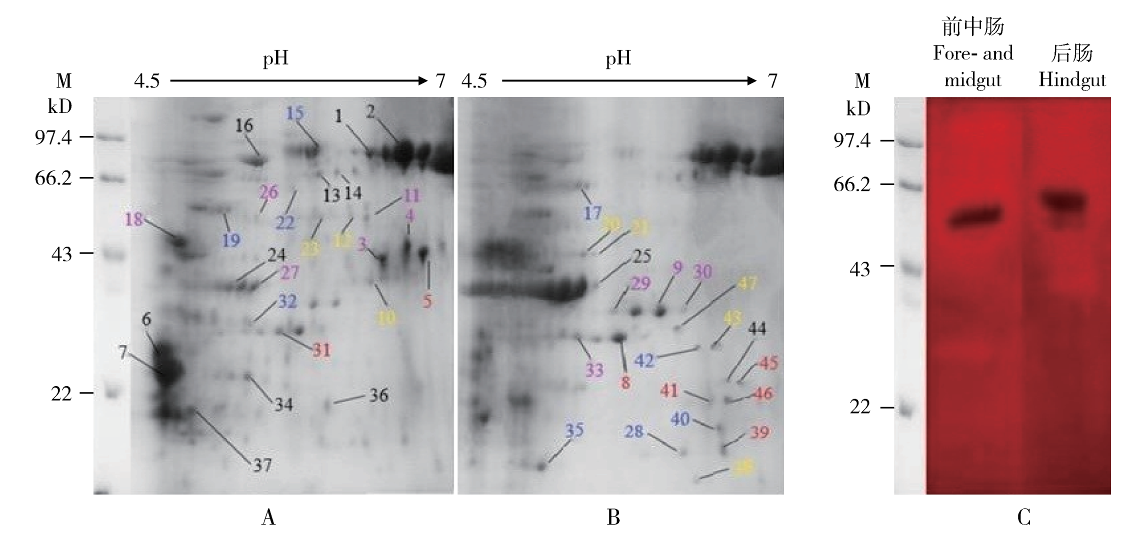


图 2 扩头蔡白蚁肠道及其内容物蛋白的双向电泳图谱

Fig. 2 2-DE analysis of proteins in the gut including gut contents of *Tsaitermes ampliceps*

A: 前中肠蛋白 Proteins in the fore- and midgut; B: 后肠蛋白 Proteins in the hindgut. 图中的数字为进行扣点测序的蛋白,数字的颜色表示蛋白的功能(黑色示结构蛋白;蓝色示调节蛋白;粉红色示白蚁代谢蛋白;红色示微生物代谢蛋白;黄色示未测出蛋白)。The number shows the proteins selected to sequence. The color of number shows the function of proteins (black showing the structural proteins, blue showing the regulatory proteins, pink showing the metabolism-related proteins in termites, red showing the metabolism-related proteins in microorganism, and yellow showing the undetected proteins). C: 加 1% CMC-Na 筛选底物的 SDS-PAGE 电泳图谱 The SDS-PAGE figure when adding 1% CMC-Na as the substrate.

2.2　扩头蔡白蚁肠道及其内容物蛋白的鉴定

对高表达或高差异表达的 47 个蛋白点进行扣点和 MALDI-TOF/MS 测序，成功匹配出 39 个蛋白，表 1 是通过 MS/MS 分析前中肠和后肠的差异蛋白功能信息，从表中可以看出测序蛋白可以分为 4 类：(1)结构蛋白：1 个副肌球蛋白(图 2 中 16)、1 个角蛋白 1(图 2 中 37)、2 个原肌球蛋白(图 2 中 6 和 7)、5 个肌动蛋白(图 2 中 24，25，34，36 和 44)、4 个昆虫储存蛋白(图 2 中 1，2，13 和 14)；(2)调节蛋白：1 个转铁蛋白(图 2 中 15)、1 个致死蛋白 2(图 2 中 35)、1 个钙调素蛋白(图 2 中 32 号假定蛋白与 Ca^{2+} 转运有关)、2 个储铁蛋白(图 2 中 28 和 42)、4 个热激蛋白(图 2 中 17，19，22 和 40)；(3)白蚁代谢蛋白：1 个 E4 酯酶(图 2 中 26)、1 个脯氨酸二肽酶(图 2 中 27)、2 个内源性纤维素酶(图 2 中 3 和 4)、3 个精氨酸激酶(图 2 中 9，29 和 30，其中 29 号假定蛋白预测为精氨酸激酶)和 3 个二硫化物异构酶(图 2 中 11，18 和 33)；(4)肠道内容物微生物代谢蛋白：1 个内切 β-1，4-葡聚糖酶(图 2 中 5)、1 个谷胱甘肽 S-转移酶(图 2 中 39)、1 个 β-内酰胺酶(图 2 中 41 号蛋白有 β-内酰胺酶结构域)、1 个超氧化物歧化酶(图 2 中 46)、1 个糖基水解酶 11 家族(图 2 中 45)和 2 个醛酮还原酶(图 2 中 8 和 31)。其中结构蛋白、调节蛋白和白蚁代谢蛋白等内源性蛋白 32 个，占匹配成功蛋白 82.1%；外源性蛋白即微生物代谢蛋白 7 个，占 17.9%，从功能蛋白的种类和数量上可以判断内源性蛋白多于外源性蛋白。

2.3　扩头蔡白蚁前中肠与后肠差异表达蛋白的比较

匹配出的 39 个蛋白中，在前中肠和后肠均高效表达有 11 个，其中 4 个结构蛋白，3 个微生物代谢蛋白，主要有储存蛋白、肌球蛋白、醛酮还原酶等，表明白蚁前中肠和后肠在日常生活中均需要储存自身所需要的蛋白以及防止共价大分子结合的损害。仅在前中肠表达的蛋白有 12 个，其中 6 个白蚁代谢蛋白，主要有内源性纤维素酶、二硫化物异构酶、E4 酯酶等，推测白蚁在前中肠主要进行能量代谢活动，尤其是内源性纤维素的降解。仅在后肠表达的蛋白有 8 个，主要是微生物代谢蛋白，有糖基水解酶第十一家族、超氧化物歧化酶等，表明白蚁在后肠主要参与半纤维素和木质素的降解。蛋白在前中肠的表达量大于后肠 2 倍的有 5 个，其中有 4 个结构蛋白，主要是肌球蛋白、肌动蛋白等，表明白蚁需要在前中肠储存所需蛋白。蛋白在后肠的表达量大于前中肠的 2 倍有 3 个，主要有热休克蛋白、脯氨酸二肽酶等。以上信息在消化代谢方面可以得出白蚁前中肠主要进行白蚁代谢活动，后肠进行微生物代谢活动，可以推测白蚁吞食木头后，在前中肠进行初步消化降解，经过后肠微生物代谢进一步降解，形成微生物蛋白，再通过肛哺饲喂其他白蚁。

2.4　扩头蔡白蚁肠道木质纤维素降解酶的 3D 结构预测

从表 1 中可以看出参与木质纤维素降解和代谢相关的酶或非酶蛋白主要有 5 个(表 1 中 3，4，5，45 和 46)，通过 Cn3D 4.3 软件预测 4 个酶的高级结构(表 1 中 4，5，45 和 46)(图 3)，图 3(A)是白蚁内源性纤维素酶[GH9 家族内切葡聚糖酶，$(\alpha/\alpha)_6$ 结构]；图 3(B)是白蚁内切 β-1，4-葡聚糖酶[GH9 家族内切葡聚糖酶，$(\alpha/\alpha)_6$ 结构]；图 3(C)是 GH11 家族木聚糖酶[内切 β-1，4-木聚糖酶，β-jelly roll 结构；三级结构比对可能为 GH11/GH12)]，由白蚁共生不可培养原生动物产生的；图 3(D)是 Cu-Zn SOD(β-sandwich 结构)，来源于双翅目果蝇科的 *Scaptodrosophila lebanonensis*。为了更深入地了解这几个蛋白，用 SignalP 4.1 Server 软件分析了 5 个蛋白的信号肽序列信息，结果发现：1 个内源性纤维素酶的蛋白信号肽概率 0.885，最大分隔位点概率是 0.450，酶切位点位于第 18 与 19 位氨基酸之间；1 个内源性纤维素酶的信号肽概率 0.845，最大分隔位点概率是 0.450，酶切位点位于第 16 与 17 位氨基酸之间；1 个糖基水解酶 11 家族的蛋白信号肽概率 0.546，最大分隔位点概率是 0.450，酶切位点位于第 22 与 23 位氨基酸之间；1 个内切 β-1，4-葡聚糖酶和 1 个超氧化物歧化酶的信号肽概率分别为 0.115 和 0.099，最大分隔位点概率是 0.450，预测不到其酶切位点。

3　讨论

由于白蚁材料的特殊性，使得白蚁肠道内容物(前中肠和后肠)蛋白提取比较困难，本实验对白蚁肠道内容物双向电泳蛋白的提取和纯化方法进行了摸索。首先用肠道微生物蛋白提取方法提取白蚁肠道内容物蛋白，双向电泳图谱上的蛋白点大部分聚集在 SDS-PAGE 凝胶的靠上部分，存在这种现象的原因是可能等电聚焦不充分、SDS-PAGE 电泳时间稍少、裂解液内含有 NaCl 和 SDS 等离子试剂、白蚁肠道内容物提取的特殊性等。并对白蚁和蝗虫肠道

表 1 MALDI-TOF/MS 分析扩头蔡白蚁前中肠和后肠(含肠道内含物)的差异表达蛋白质信息

Table 1 Basic information of differentially expressed proteins identified by MALDI-TOF/MS between the fore- and midgut and the hindgut (including gut contents) of *Tsaitermes ampliceps*

电泳点 Spot	蛋白 Protein	物种 Species	GenBank 登录号 GenBank accession number	等电点理论值/实验值 Theoretical pI/measured pI	理论分子量/实验分子量(kD) Theoretical MW/measured MW	Mascot 得分 Mascot score	覆盖率(%) Coverage rate
1	昆虫储存蛋白 II Hexamerin II	北美散白蚁 *Reticulitermes flavipes*	gi|66957917	6.24/6.32	86.95/84.85	445	13
2	昆虫储存蛋白 II Hexamerin II	北美散白蚁 *R. flavipes*	gi|66957917	6.24/6.60	86.95/84.85	501	15
3	内源性纤维素酶 Endogenous cellulase	北美散白蚁 *R. flavipes*	gi|71904973	6.18/6.41	48.87/42.26	820	27
4	内切葡聚糖酶 2 Endoglucanase 2	北美散白蚁 *R. flavipes*	gi|3800444	6.18/6.58	48.89/46.88	642	20
5	内切 β-1,4-葡聚糖酶 Endo-beta-1,4-glucanase	山林原白蚁肠道微生物 Gut microbe of *Hodotermopsis sjostedti*	gi|44885830	5.49/6.71	42.94/43.55	88	6
6	假定原肌球蛋白 Putative tropomyosin	黑翅土白蚁 *Coptotermes formosanus*	gi|506965856	4.88/4.78	28.59/26.01	375	20
7	原肌球蛋白 Tropomyosin	美洲大蠊 *Periplaneta amricana*	gi|4378573	4.72/4.85	32.89/26.37	477	30
8	醛酮还原酶 Aldo-keto reductase	北美散白蚁 *R. flavipes*	gi|409690336	6.2/5.75	38.1/73.50	723	42
9	精氨酸激酶 Arginine kinase	锥须步甲 *Bembidion nr. caoduroi*	gi|669033613	6.49/6.28	27.49/37.9 0	187	15
11	二硫化物异构酶 A3 Disulfide-isomerase A3 isoform	西方蜜蜂 *Apis mellifera*	gi|66546657	5.57/6.35	56.22/56.88	83	4
13	昆虫储存蛋白 II Hexamerin II	北美散白蚁 *R. flavipes*	gi|66957917	6.24/6.28	86.95/78.8	524	12
14	昆虫储存蛋白 II Hexamerin II	北美散白蚁 *R. flavipes*	gi|66957917	6.24/6.04	86.95/78.8	538	12
15	转铁蛋白 Transferrin	内华达古白蚁 *Zootermopsis nevadensis*	gi|646716506	5.81/5.98	81.49/82.8	111	2
16	副肌球蛋白 Paramyosin	跳镰猛蚁 *Harpegnathos saltator*	gi|307191730	7.77/5.58	85.07/81.2	215	4
17	70 kD 热激蛋白 70 kD heat shock protein	烟粉虱 *Bemisia tabaci*	gi|156254075	5.33/5.43	71.71/70.68	429	9
18	二硫化物异构酶 2 Disulfide-isomerase2	柑桔木虱 *Diaphorina citri*	gi|662205677	4.62/4.92	54.91/52.18	92	2
19	线粒体 60 kD 热激蛋白 60 kD heat shock protein, mitochondrial	内华达古白蚁 *Z. nevadensis*	gi|646707199	5.66/5.68	61.01/ 60.08	704	20
22	70 kD 热激蛋白 8 Heat shock 70 kD protein 8	斑马鱼 *Danio rerio*	gi|2495341	5.18/5.78	71.16/65.76	437	11
24	肌动蛋白 Actin, partial	黑盲蝽 *Adelphocoris suturalis*	gi|586830426	5.17/5.35	34.31/38.44	780	39
25	肌动蛋白 Actin	中国水仙 *Narcissus tazetta* var. *chinensis*	gi|344050159	5.31/5.66	42.00/38.44	283	11
26	脂酶 E4 样 Esterase E4-like	潜蝇茧蜂 *Fopius arisanus*	gi|755934042	5.95/5.54	61.28/60.01	113	3
27	X 脯氨酸二肽酶 X-Pro dipeptidase	厄尔纳拉乳杆菌 *Lactobacillus ultunensis*	gi|494201223	5.13/5.58	40.93/38.44	70	3
28	储铁蛋白大亚基 Ferritin, heavy subunit	黑翅土白蚁 *C. formosanus*	gi|506968001	5.54/6.12	25.08/20.18	276	13

续表 1 Table 1 continued

电泳点 Spot	蛋白 Protein	物种 Species	GenBank 登录号 GenBank accession number	等电点理论值/实验值 Theoretical pI/measured pI	理论分子量/实验分子量(kD) Theoretical MW/measured MW	Mascot 得分 Mascot score	覆盖率(%) Coverage rate
29	假定蛋白 L798_04756 Hypothetical protein L798_04756, partial	内华达古白蚁 *Z. nevadensis*	gi|646718422	5.50/5.65	40.31/37.90	429	22
30	精氨酸激酶 Arginine kinase	柑桔木虱 *D. citri*	gi|646718422	6.03/6.32	36.89/37.90	331	20
31	醛酮还原酶 Aldo-keto reductase	北美散白蚁 *R. flavipes*	gi|409690336	6.20/5.85	38.10/37.50	645	37
32	假定蛋白 L798_09047 Hypothetical protein L798_09047	内华达古白蚁 *Z. nevadensis*	gi|646712156	5.08/5.50	28.25/28.37	225	11
33	二硫化物异构酶 Disulfide-isomerase-like	柑桔木虱 *D. citri*	gi|662205677	5.20/5.63	34.55/37.50	101	6
34	肌动蛋白 Actin	鲫鱼 *Carassius auratus*	gi|3396073	5.15/5.50	24.34/26.37	141	11
35	致死必需蛋白 2 Protein lethal (2) essential for life	内华达古白蚁 *Z. nevadensis*	gi|646721496	6.04/5.25	24.33/18.22	377	30
36	肌动蛋白 Actin	家蚕 *Bombyx mori*	gi|480318369	5.47/6.08	22.75/21.62	250	27
37	角蛋白 1 Keratin 1	现代人 *Homo sapiens*	gi|7331218	8.16/5.18	66.15/21.22	141	4
39	假定谷胱甘肽 S-转移酶 Glutathione S-transferase, putative	体虱 *Pediculus humanus corporis*	gi|242012337	7.68/6.68	23.91/20.18	67	4
40	热激蛋白样蛋白 Heat shock protein-like protein	黑翅土白蚁 *C. formosanus*	gi|506968219	6.30/6.58	20.44/20.88	453	49
41	假定 ETHE1 蛋白 Putative ETHE1 protein, partial	内华达古白蚁 *C. formosanus*	gi|506965876	7.71/6.52	30.71/22.67	118	10
42	储铁蛋白大亚基 Ferritin, heavy subunit	黑翅土白蚁 *C. formosanus*	gi|506968001	5.54/6.48	25.08/25.69	444	21
44	β 肌动蛋白 Beta actin	边缘革蜱 *Dermacentor marginatus*	gi|31562016.86	5.27/6.68	16.12/23.86	161	20
45	假定糖基水解酶家族 11 Putative glycosyl hydrolase family11	黄胸散白蚁未培养原生动物 Uncultured symbiotic protist of *Reticulitermes speratus*	gi|146197111	5.63/6.72	24.55/23.86	77	5
46	超氧化酶歧化酶 Superoxide dismutase, partial	花果蝇 *Scaptodrosophila lebanonensis*	gi|2511719	5.79/6.68	15.35/ 22.67	79	8

表中第 1 列的数字与图 2 中的数字对应，是扣取的蛋白点。MS 得分 >65 表明有广泛的同源性。The number in the first column in the table corresponds to the number in Fig. 2, which is the extracted protein point. Mascot scores >65 indicate the identity or extensive homology.

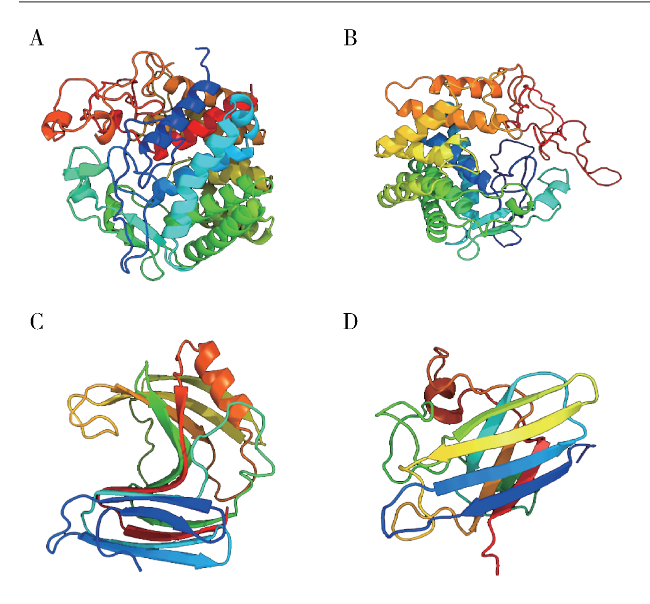


图 3 扩头蔡白蚁肠道木质纤维素降解酶的蛋白结构预测

Fig. 3 Protein structure prediction of lignocellulolytic enzymes in the gut of *Tsaitermes ampliceps*

A：白蚁内源性纤维素酶[GH9 家族内切葡聚糖酶，$(\alpha/\alpha)_6$ 结构] Endogenous cellulose from termites [GH9s, $(\alpha/\alpha)_6$]; B：白蚁内切 β-1,4-葡聚糖酶[GH9 家族内切葡聚糖酶$(\alpha/\alpha)_6$ 结构] Endo-beta-1,4-glucanase HsEG4 from termites [GH9s, $(\alpha/\alpha)_6$]; C：来源于不可培养微生物的内切 β-1,4-木聚糖酶(GH11 家族木聚糖酶，β-jelly roll 结构) Endo-β-1,4-xylanase (GH11, β-jelly roll) from uncultured microorganism; D：来源于互利共生微生物的 Cu-Zn SOD(β-sandwich 结构) Cu-Zn SOD (β-sandwich) from mutualistic microorganisms.

微生物蛋白提取进行了比较，发现相同实验方法和总蛋白量的白蚁的双向电泳图谱比蝗虫的蛋白点少得多，可能是由于白蚁肠道过于纤细，无法剥离，匀浆后残留肠壁组织、脂肪、核酸及糖类等杂质。然后采用植物组织蛋白提取方法(耿旭等, 2010)并进行改进，比如增加 pH 8.0 Tris-平衡酚，可以有效地使蛋白和其他杂质分开，从而达到纯化的目的，但是双向电泳图谱显示并不理想。最后增加 Micro PES 树脂过滤蛋白的提取方法，使蛋白与杂质分开，使蛋白样品损失较少，蛋白点清晰透亮，白蚁前中肠和后肠蛋白差异明显，便于后续差异蛋白的扣点和测序分析。

通过 UniProt, ExPASy, NCBI 和 GenBank 等数据库分析匹配成功的 39 个蛋白点，预测扩头蔡白蚁前中肠与后肠差异蛋白功能，这些蛋白包括结构蛋白、调节蛋白、白蚁代谢蛋白和白蚁肠道微生物代谢蛋白四大类；从测序的蛋白可以看出结构蛋白占总测得蛋白的 1/3，主要有储存蛋白、肌球蛋白、肌动蛋白等(表 1)。储存蛋白是昆虫普遍存在的一种特异性血淋巴蛋白，通常在幼虫的脂肪体内合成，释放到血淋巴中，之后被脂肪体选择性吸收，作为氨基酸的贮存库，并对成虫发育和雌性卵发育起重要的作用(马彩霞等, 2002)。肌动蛋白与整合蛋白结合在一起，组成细胞的骨架，展示特有的物理和空间结构特征(Geiger *et al*., 2009)。扩头蔡白蚁中高表达或高差异表达的调节蛋白有 9 个，主要有热激蛋白、钙调素蛋白、储铁蛋白等(表 1)。其中热激蛋白是生物体在不利环境因素刺激下应激合成的一组进化上高度保守的蛋白质(曲凌云等, 2004)。钙调素(CaM)作为最重要的一类 Ca^{2+} 传感蛋白可通过与其下游的 CaM 结合蛋白(CaMBP)作用调节细胞的生理功能。因此 CaMBP 的研究是揭示 CaM 作用机制的重要内容，是探明 Ca^{2+}-CaM 信号转导系统的关键。因此白蚁自身分泌调节蛋白主要是白蚁受到外界干扰或自身信号传导的影响。

白蚁代谢蛋白主要包括木质纤维素降解酶、精氨酸激酶、醛酮还原酶、二硫化物异构酶、谷胱甘肽 S-转移酶等，其中精氨酸激酶是昆虫能量代谢的关键酶，与白蚁的食物消化和生长发育密切相关；另外内质网是一种高度特化的细胞器，涉及到细胞外膜蛋白和分泌蛋白的成熟，其中二硫键形成是关键的一步(Sevier and Kaiser, 2002)，而白蚁肠道内容物中的二硫化物异构酶和谷胱甘肽 S-转移酶都有氧化还原酶的作用，推测也参与内质网折叠过程中半胱氨酸残基的巯氢基的氧化连接(Sevier and Kaiser, 2006; Schröder, 2008)，它们通过底物蛋白的巯基-二硫化物的交换机制转移二硫键(Sevier and Kaiser, 2006)，形成二硫键，而这个二硫键被直接转移到分泌蛋白，参与分泌蛋白的结构形成(Tu and Weissman, 2004; Seo *et al*., 2015)。

迄今为止，人们在白蚁肠道共生微生物中获得的外源纤维素酶基因已近千个，主要分属糖基水解酶家族的第 5 家族、第 7 家族和第 45 家族(GH5, GH7 和 GH45)，并已在大肠杆菌 *Escherichia coli* 中成功表达近百个，而白蚁内源纤维素酶基因只有约 20 种得到克隆，属于 GH9，目前只有部分在原核表达成功的报道，所以白蚁的内源性纤维素酶需要更深入地研究。本实验成功鉴定到了参与木质纤维素降解和代谢相关的酶有 5 个，分别是 2 个白蚁内源性纤维素酶[GH9 家族内切葡聚糖酶，$(\alpha/\alpha)_6$ 结构，来源于北美散白蚁 *R. flavipes*]、1 个白蚁内切 β-1,4-葡聚糖酶[GH9 家族内切葡聚糖酶，$(\alpha/\alpha)_6$ 结构，来源于山林原白蚁 *H. sjostedti*]、1 个 GH11 家族

木聚糖酶[内切β-1,4-木聚糖酶,β-jelly roll 结构),由白蚁共生原生动物产生的]、1 个 Cu-Zn SOD[(β-sandwich 结构),来源于双翅目果蝇科花果蝇属的 *Scaptodrosophila lebanonensis*](图 3),由于木质素分解时产生细胞色素的自由基,抗氧化酶可减少自由基,已经应用于工业木质纤维素降解的预处理(Brune *et al.*, 1994)。而 SOD 可以保护中毒的白蚁消化道共生有机体的木质素降解产物,因此,它或许可以保护由木质素降解产生的氧化毒害。本实验的研究鉴定的酶都在白蚁的木质纤维素降解中起非常重要的作用,因此,下一步可以对这些酶进行分离纯化或者结构改造,提高酶的活性,应用于木质纤维素生物能源的高效降解。

参考文献(References)

Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72(1-2): 248-254.

Brune A, Stingl U, 2006. Prokaryotic symbionts of termite gut flagellates: phylogenetic and metabolic implications of a tripartite symbiosis. *Prog. Mol. Subcell. Biol.*, 41: 39-60.

Brune H, Röder H, Boragno C, Kern K, 1994. Microscopic view of nucleation on surfaces. *Phys. Rev. Lett.*, 73(14): 1955-1958.

Chen H, Mei JF, Min H, 2005. Microorganisms in termite gut. *J. Microbiol.*, 25(2): 75-79. [陈虹, 梅建凤, 闵航, 2005. 白蚁肠道微生物. 微生物学杂志, 25(2): 75-79]

Coy MR, Salem TZ, Denton JS, Kovaleva ES, Liu Z, Barber DS, Campbell JH, Davis DC, Buchman GW, Boucias DG, Scharf ME, 2010. Phenol-oxidizing laccases from the termite gut. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 40(10): 723-732.

Duan J, Liu J, Ma X, Zhang Y, Wang X, Zhao K, 2017. Isolation, identification, and expression of microbial cellulases from the gut of *Odontotermes formosanus*. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 27(1): 122-129.

Feng T, Liu H, Xu Q, Sun J, Shi H, 2015. Identification and characterization of two endogenous β-glucosidases from the termite *Coptotermes formosanus*. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 176(7): 2039-2052.

Franco Cairo JP, Leonardo FC, Alvarez TM, Ribeiro DA, Büchli F, Costa-Leonardo AM, Carazzolle MF, Costa FF, Paes Leme AF, Pereira GA, Squina FM, 2011. Functional characterization and target discovery of glycoside hydrolases from the digestome of the lower termite *Coptotermes gestroi*. *Biotechnol. Biofuel.*, 4: 50.

Geiger B, Spatz JP, Bershadsky AD, 2009. Environmental sensing through focal adhesions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 10(1): 21-23.

Geng X, Huang SX, Cai JP, 2010. Relativity between physiological state of mould altivity and concentration change of CO_2 in stored grain. *J. Henan Univ. Technol. (Nat. Sci. Ed.)*, 31(3): 12-15. [耿旭, 黄淑霞, 蔡静平, 2010. 储粮中霉菌活动的生理状态与粮堆 CO_2 浓度变化的相关性. 河南工业大学学报(自然科学版), 31(3): 12-15]

Hirayama K, Watanabe H, Tokuda G, Kitamoto K, Arioka M, 2010. Purification and characterization of termite endogenous β-1, 4-endoglucanases produced in *Aspergillus oryzae*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 74(8): 1680-1686.

Hongoh Y, 2010. Diversity and genomes of uncultured microbial symbionts in the termite gut. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 74(6): 1145-1151.

Katahira S, Muramoto N, Moriya S, Nagura R, Tada N, Yasutani N, Ohkuma M, Onishi T, Tokuhiro K, 2017. Screening and evolution of a novel protist xylose isomerase from the termite *Reticulitermes speratus* for efficient xylose fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Biofuel.*, 10(1): 203.

Lawton JH, Bignell DE, Bloemers GF, Eggleton P, Hodda ME, 1996. Carbon flux and diversity of nematodes and termites in Cameroon forest soils. *Biodiv. Conserv.*, 5(2): 261-273.

Lima TdeA, Pontual EV, Dornelles LP, Amorim PK, Sá RA, Coelho LC, Napoleão TH, Paiva PM, 2014. Digestive enzymes from workers and soldiers of termite *Nasutitermes corniger*. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, 176: 1-8.

Ma CX, Liu HX, Sha ZL, Li YP, 2002. Progress in research on insect storage proteins. *Entomol. Knowl.*, 39(6): 416-420. [马彩霞, 刘惠霞, 沙忠利, 李怡萍, 2002. 昆虫体内储存蛋白的研究进展. 昆虫知识, 39(6): 416-420]

Martin MM, 1983. Cellulose digestion in insects. *Comp. Biochem. Physiol.*, 75A: 313-324.

Mohr KI, Tebbe CC, 2006. Diversity and phylotype consistency of bacteria in the guts of three bee species (Apoidea) at an oilseed rape field. *Environ. Microbiol.*, 8(2): 258-272.

Nimchua T, Thongaram T, Uengwetwanit T, Pongpattanakitshote S, Eurwilaichitr L, 2012. Metagenomic analysis of novel lignocellulose-degrading enzymes from higher termite guts inhabiting microbes. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 22(4): 462-469.

Otagiri M, Lopez CM, Kitamoto K, Arioka M, Kudo T, Moriya S, 2013. Heterologous expression and characterization of a glycoside hydrolase family 45 endo-β-1,4-glucanase from a symbiotic protist of the lower termite, *Reticulitermes speratus*. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 169(6): 1910-1918.

Qu LY, Sun XQ, Xiang JH, Hong XG, Zhang JX, 2004. Advances in study on heat shock protein. *Adv. Mar. Sci.*, 22(3): 385-391. [曲凌云, 孙修勤, 相建海, 洪旭光, 张进兴, 2004. 热休克蛋白研究进展. 海洋科学进展, 22(3): 385-391]

Rashamuse K, Tendai WS, Mathiba K, Ngcobo T, Mtimka S, Brady D, 2017. Metagenomic mining of glycoside hydrolases from the hindgut bacterial symbionts of a termite (*Trinervitermes trinervoides*) and the characterization of a multimodular β-1, 4-xylanase (GH11). *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 64(2): 174-186.

Schmitt-Wagner D, Friedrich MW, Wagner B, Brune A, 2003. Axial dynamics, stability, and interspecies similarity of bacterial community structure in the highly compartmentalized gut of soil-

feeding termites (*Cubitermes* spp.). *Appl. Environ. Microbiol.*, 69 (10): 6018–6024.

Schröder M, 2008. Engineering eukaryotic protein factories. *Biotechnol. Lett.*, 30(2): 187–196.

Seo M, Ryou HJ, Yun EY, Goo TW, 2015. Molecular characterization of endoplasmic reticulum oxidoreductin 1 from *Bombyx mori*. *Int. J. Mol. Sci.*, 16(11): 26520–26529.

Sethi A, Kovaleva ES, Slack JM, Brown S, Buchman GW, Scharf ME, 2013. A GHF7 cellulase from the protist symbiont community of *Reticulitermes flavipes* enables more efficient lignocellulose processing by host enzymes. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 84(4): 175–193.

Sevier CS, Kaiser CA, 2002. Formation and transfer of disulphide bonds in living cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 3(11): 836–847.

Sevier CS, Kaiser CA, 2006. Disulfide transfer between two conserved cysteine pairs imparts selectivity to protein oxidation by Ero1. *Mol. Biol. Cell*, 17(5): 2256–2266.

Slaytor M, 1992. Cellulose digestion in termites and cockroaches: what role do symbionts play? *Comp. Blochem. Physiol.*, 103B(4): 775–784.

Su LJ, Chen M, Liu GJ, Liu H, Song AD, Yin XM, 2011. Anatomic studies on digestive, reproductive system of *Tsaitermes ampliceps* and comparing with *Odontotermes formosanus*. *Chin. J. Appl. Entomol.*, 48(4): 1024–1032. [苏丽娟, 陈明, 刘国举, 刘航, 宋安东, 尹新明, 2011. 扩头蔡白蚁消化与生殖系统解剖及其与黑翅土白蚁的比较研究. 应用昆虫学报, 48(4): 1024–1032]

Sun JZ, Scharf ME, 2010. Exploring and integrating cellulolytic systems of insects to advance biofuel technology. *Insect Sci.*, 17(3): 163–165.

Tartar A, Wheeler MM, Zhou X, Coy MR, Boucias DG, Scharf ME, 2009. Parallel metatranscriptome analyses of host and symbiont gene expression in the gut of the termite *Reticulitermes flavipes*. *Biotechnol. Biofuel.*, 2(1): 25.

Tu BP, Weissman JS, 2004. Oxidative protein folding in eukaryotes: mechanisms and consequences. *J. Cell Biol.*, 164(3): 341–346.

Watanabe H, Tokuda G, 2010. Cellulolytic systems in insects. *Annu. Rev. Entomol.*, 55: 609–632.

Xiang H, Zhou ZH, 2009. Lignocellulolytic enzymes in termite and its symbiotic microbes. *Chin. Bull. Entomol.*, 46(1): 32–40. [相辉, 周志华, 2009. 白蚁及共生微生物木质纤维素水解酶的种类. 昆虫知识, 46(1): 32–40]

Xie L, Zhang L, Zhong Y, Liu N, Long YH, Wang SY, Zhou XG, Zhou ZH, Huang YP, Wang Q, 2012. Profiling the metatranscriptome of the protistan community in *Coptotermes formosanus* with emphasis on the lignocellulolytic system. *Genomics*, 99(4): 246–255.

Zhang D, Lax AR, Raina AK, Bland JM, 2009. Differential cellulolytic activity of native-form and C-terminal tagged-form cellulase derived from *Coptotermes formosanus* and expressed in *E. coli*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 39(8): 516–522.

Zhou X, Smith JA, Oi FM, Koehler PG, Bennett GW, Scharf ME, 2007. Correlation of cellulase gene expression and cellulolytic activity throughout the gut of the termite *Reticulitermes flavipes*. *Gene*, 395(1–2): 29–39.

(责任编辑: 马丽萍)